

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

# Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 03030665  
PUBLICATION DATE : 08-02-91

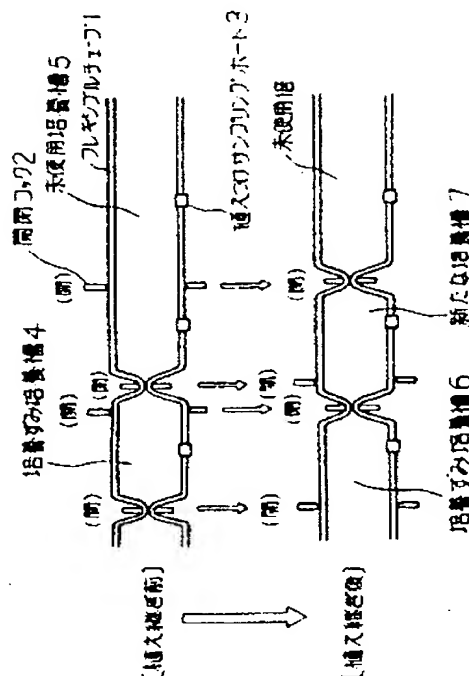
APPLICATION DATE : 28-06-89  
APPLICATION NUMBER : 01163729

**APPLICANT : MITSUBISHI HEAVY IND LTD;**

**INVENTOR : NISHI ATSUKO:**

INT.CL. : C12M 1/32

**TITLE : AUTOMATICALLY SUBCULTURING  
DEVICE**



**ABSTRACT :** PURPOSE: To readily and automatically carry out subculture of microorganism, cell, etc., by opening and closing a flexible tube containing a culture medium packed therein with a number of cooks in the longitudinal direction and blending a culture medium of a microorganism with the new culture medium.

**CONSTITUTION:** A culture medium is packed into the inside of a flexible tube 1 capable of sterilizing bacterium and made of flexible material having O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> permeable properties and the tube is fastened at the prescribed positions with a number of and clothing cock 2 in longitudinal direction to prepare the culture tank. Then microorganism or cell is cultured in the culture tank and after definite time, culture medium is blended with new culture medium by moving a fastening position of cock in a state in which microorganism or cell is sufficiently proliferated. Thus, new culture tank is prepared to automatically carry out subculture of microorganism or cell, etc.

**COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio**

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-30665

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)2月8日

C 12 M 1/32

8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 自動植え継ぎ装置

⑰ 特 願 平1-163729

⑱ 出 願 平1(1989)6月28日

⑲ 発 明 者	岡 崎	洋	兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内
⑲ 発 明 者	高 沖	宗 夫	兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内
⑲ 発 明 者	松 本	浩 明	兵庫県神戸市兵庫区和田崎町1丁目1番1号 三菱重工業株式会社神戸造船所内
⑲ 発 明 者	西	敦 子	兵庫県神戸市兵庫区小松通5丁目1番16号 株式会社三菱ハイテック内
⑲ 出 願 人	三菱重工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番1号		
⑲ 代 理 人	弁理士 内 田 明 外2名		

## 明 細 書

## 1 発明の名称

自動植え継ぎ装置

## 2 特許請求の範囲

培地を充填したフレキシブルチューブと、該チューブを締めつけたり緩めたりすることができ多数のコックを該チューブの長手方向に適宜間隔を置いて多数設けてなることを特徴とする微生物、細胞などの自動植え継ぎ装置。

## 3 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明はセルライン(cell-line)を確保するよう予備的な培養操作を自動化した自動継代培養装置に適用される微生物、細胞などの自動植え継ぎ装置に関する。

## 〔従来の技術〕

従来、微生物、細胞などの植え継ぎは、プラスチック又はガラス製の培養容器(ビン、フラスコ、シャーレ、チューブ等)とピペットを用いてすべて人手で行われている。植え継ぎ操作

は無菌的に行う必要があるため、バイオクリーンベンチ内で行うのが普通である。

これまでに、微生物、細胞などの植え継ぎを自動的に行うような装置は存在していない。

〔発明が解決しようとする課題〕

微生物や細胞を培養する場合、新しい環境に馴らすために予備培養と植え継ぎを数回くり返すのが普通である。又凍結に弱い細胞の場合は株を保存する目的のためだけでも培養と植え継ぎをくり返さなければならない。さらに植え継ぎ操作は所定の時間に行わなければならないので休日出勤を余儀なくされるなど、研究員に対する負荷は大きい。又宇宙における実験では作業時間が制限されることから、実験操作の自動化は必須である。

本発明は上記技術水準に鑑み、微生物、細胞などを自動的に植え継ぎすることができる装置を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は培地を充填したフレキシブルチュー

ブと、該チューブを締めつけたり緩めたりすることができる多数のコックを該チューブの長手方向に適宜間隔をおいて多数設けてなることを特徴とする微生物、細胞などの自動植え継ぎ装置である。

#### 〔作用〕

フレキシブルな材質からなるチューブの内側に培地を満たし、チューブの所定の位置をコックでしめつけて一定容量の培養槽を作る。この槽内で微生物又は細胞を培養し、一定時間後微生物又は細胞が十分に増殖したらコックのしめつけ位置を移動させて、増殖した微生物又は細胞の入った培養液と新しい培地が一定の割合で混合するようにして、新しい培養槽を作る。この操作をくり返すことにより、一定時間毎に自動的に植え継ぎを行う。

本発明装置はメカニズムが単純であるため自動化が容易である。さらにこのような操作は無菌的に行う必要があるが、本発明装置によれば培養液が直接外気に接触しないため、汚染の危

うとする場合、まず培養済み培養槽4を9:1に分割する部位のコック2と未使用培養槽5から9ccの培地を分取する部位のコック2を閉めると同時に、植え継ぎ前に培養済み培養槽4を形づくっていた2個所のコック2を開ける。これら一連の操作により、新たな培養槽7の中には培養済み培養液1ccと新しい培地9ccが混入することになる。その状態の一例を第1図の下図に示す。この下図の新たな培養槽7が前操作の培養済み培養液1ccと未使用培養槽5の培地9ccを含む槽である。

植え継ぎ操作に関しては厳密な定量性は要求しないものゝ、ある程度の定量性は必要である。本発明装置の場合、例えば1/100に希釈しようとする時には、非常に長いチューブを用いない限り無理がある。そこで1/10希釈操作を連続的に2回行うことによつて1/100の希釈が対応できる。

コック2の開閉機構は多数のコックを設置し順に開閉してゆく方法と、2個のコック2を1

険性が少ない。又地上のみならず無重力下でも作動可能である。

#### 〔実施例〕

本発明装置の一実施例を第1図によつて説明する。

フレキシブルチューブ1は滅菌が可能でO<sub>2</sub>及びCO<sub>2</sub>透過性を有する材質からなるものが用いられる。又植えつけや培養液の回収を行う際に注射針をつき刺す必要があるため、チューブ1には注射針を刺しても液もれしない植えつけ・サンプリングポート3を設けることが好ましい。適当な間隔に設置したコック2の開閉により、培養液と新しい培地を混合することにより植え継ぎを行なう。この際培養液と新しい培地との混合比は1:9を限度とし、高倍率の希釈が必要な場合は連続して同じ操作をくり返すことに対応する。例えば第1図の培養済み培養槽4の中に培養液が10cc入つていけるとする。又未使用培養槽5には新しい培地が入つている。この培養済み培養液1ccと新しい培地9ccを混合し

組として4個のコック2をもつてチューブ1やコック2の位置をずらしながら開閉してゆく方法等が考えられる。

又、付着性細胞を培養する場合には、培地にマイクロキャリア等の支持材を混ぜることに対応する。

第2図は第1図中の開閉コック2とフレキシブルチューブ1の一部について本発明装置を適用した自動継代培養装置の機能ブロック図を示す。この装置はフレキシブルチューブ、開閉コック、自動開閉機構、制御機構及び攪拌機構からなる。攪拌の手法としてはフレキシブルチューブ内にマグネットの回転子を封入し、フレキシブルチューブの外側からスターラーを用いて回転させる方法や、フレキシブルチューブを外側からしごく方法等が適用可能であり、これにより培養槽の内容物を均一化し、適正な植え継ぎを可能とする。又培養時の環境(温度、湿度、ガス成分)を制御するため、この装置はインキュベータ内を使用する。

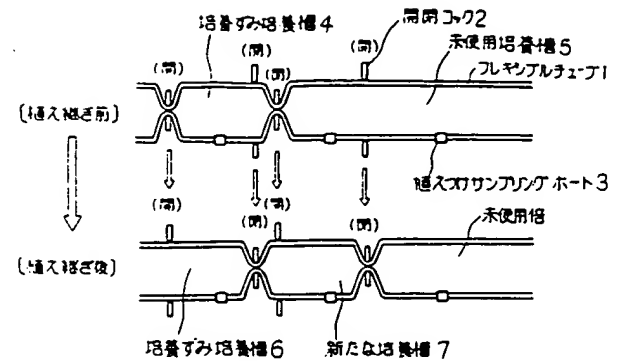
〔 発 明 の 効 果 〕

本発明により、微生物、細胞などの植え継ぎの自動化を図ることが容易となる。

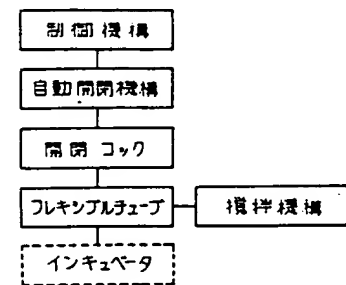
▲ 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例の説明図、第2図は本発明を適用した自動継代培養装置の機能ブロック図である。

第1図



第2図



代理人	内	田	明
代理人	萩	原	亮一
代理人	安	西	篤夫

TRANSLATION FROM JAPANESE

(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(11) Unexamined Patent Application (Kokai) No. 3-30665  
(12) Publication of Unexamined Patent Application (A)  
  
(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: Classification Symbols: Internal Office  
Registration Nos.:  
C 12 M 1/32 8717-4B

(43) Disclosure Date: February 8, 1991  
Request for Examination: Not filed  
Number of Claims: 1  
(Total of 3 pages [in original])

---

(54) Title of the Invention: Automatic Subculturing Device  
(21) Application No. 1-163729  
(22) Filing Date: June 28, 1989  
(72) Inventor: Hiroshi Okazaki  
(72) Inventor: Muneo Takaoki  
(72) Inventor: Hiroaki Matsumoto  
(72) Inventor: Atsuko Nishi  
(71) Applicant: Mitsubishi Heavy Industries  
(74) Agent: Akira Uchida, Patent Attorney (and two others)

**SPECIFICATION**

**1. Title of the Invention**

Automatic Subculturing Device

**2. Claims**

1. An automatic subculturing device for microbes, cells, and the like, characterized by comprising a flexible tube filled with medium, and a plurality of cocks disposed in a plurality of locations at suitable intervals along the length of the flexible tube for clamping and unclamping the tube.

**3. Detailed Description of the Invention**

**Field of Industrial Application**

The present invention relates to an automatic subculturing device for microbes, cells, and the like, suitable for use in automatic subculturing devices in which the preparatory culturing procedures for ensuring a cell line are automated.

**Prior Art**

Subcultures of microorganisms, cells, and the like have conventionally been managed manually using culturing vessels of plastic or glass (bottles, flasks, Petri dishes, and tubes) and pipettes. It is essential that such subculturing be accomplished aseptically, which is why it typically takes place in bio-clean benches.

Until now, there have been no automated devices for such microbial and cell subculturing.

## Problems Which the Invention Is Intended to Solve

During microbial and cell culture, pre-incubation and subculturing are typically done a number of times for acclimatization to the new environment. Culture and subculture must also be managed repeatedly to preserve lines of cells that are not amenable to lyophilization. As subculturing also takes a certain amount of time, it can be quite laborious for researchers, who sometimes must keep on working until the procedure is finished. Due to limited time in space research, automated experimental procedures are critical.

The present invention is intended to provide a device capable of the automated subculture of microbes, cells, and the like.

## Means for Solving the Abovementioned Problems

The present invention is an automatic subculturing device for microbes, cells, and the like, characterized by comprising a flexible tube filled with medium, and a plurality of cocks disposed in a plurality of locations at suitable intervals along the length of the flexible tube for clamping and unclamping the tube.

## Utilization of the Invention

The interior of the tube consisting of a flexible material is filled with medium, and the tube is clamped by cocks at certain locations, thus creating culture chambers of a certain volume. Microbes or cells are cultured in these chambers. Once the microbes or cells have grown sufficiently after a certain period of time has elapsed, the cocks are loosened to allow the broth containing the growing microbes and cells to be mixed with a certain proportion of fresh medium in a new culture chamber. This procedure is repeated to enable automatic subcultures at periodic intervals.



The device of the present invention is readily operated because of its simple mechanism. As such operations must be done in an aseptic manner, the device of the present invention is less likely to result in contamination since the broth never comes into direct contact with outside air. This may be done in zero-gravity environments as well as on earth.

#### Examples

An example of the device in the present invention is illustrated in Figure 1.

A flexible tube 1 comprises a CO<sub>2</sub>-permeable material that can be sterilized. Since an injection needle must be used during inoculation and recovery of the broth, the tube 1 should be provided with an inoculating and sampling port 3 which will not leak when penetrated by such an injection needle. Cocks 2 located at suitable intervals are opened and closed to allow the broth to be mixed with fresh medium for subculture. At such times, the broth and fresh medium are limited to a 1:9 mixing ratio. In cases where a high dilution ratio is required, the above procedure can be continuously repeated. For example, 10 cc broth is in a culture chamber 4 where culture is finished. Fresh medium is introduced into the unused culture chamber 5. When 1 cc of the broth is mixed with 9 cc of the fresh medium, the cock 2 at a location capable of proportioning the culture chamber 4 to a ratio of 9:1 and the cock 2 at a location proportioning 9 cc medium from the unused culture chamber 5 are closed, while the cocks 2 in the two locations forming the culture chamber 4 before the subculture are opened. This series of operations allows 1 cc of broth to be mixed with 9 cc of fresh medium in a new culture chamber 7. An example of such a state is illustrated at the bottom of Figure 1. In that bottom part of the figure, the new culture chamber 7 contains 1 cc of pre-culture broth and 9 cc of medium from the unused culture chamber 5.

Although stringent quantification is not critical for subculturing, a certain degree is required. In the device of the present invention, an extremely long tube would have to be used for 1/100 dilution, for example. Such 1/100 dilution can be managed, however, by two consecutive 1/10 dilution operations.

The mechanism for opening and closing the cocks 2 can be based on a method for opening and closing a plurality of cocks in a certain sequence, or a method in which sets of 2 cocks 2 are used, where four cocks 2 are opened and closed as the tube 1 or the cock 2 positions are shifted.

In the case of adhesion of cell cultures, a support material such as a microcarrier can be mixed with the medium.

Figure 2 is a block diagram of the functions of an automatic subculturing device featuring the use of the device of the present invention for the opening-and-closing cocks 2 and the flexible tube 1 in Figure 1. The device comprises a flexible tube, opening-and-closing cocks, an automatic opening and closing mechanism, a control mechanism, and a stirring device. The stirring may be managed by enclosing a magnet rotor in the flexible tubing, but is rotated using a stirrer outside the flexible tube, or by externally squeezing the flexible tube. This will allow the contents in the culture tank to be uniformly mixed for suitable subculture. The device is used in an incubator to control the environment (temperature, humidity, gas components).

#### Merits of the Invention

The present invention helps to automate the subculture of microbes, cells, and the like.

#### 4. Brief Description of the Figures

Figure 1 illustrates an example of the present invention, and Figure 2 is a block diagram of the functions of an

automatic subculturing device featuring the use of the present invention.

Figure 1

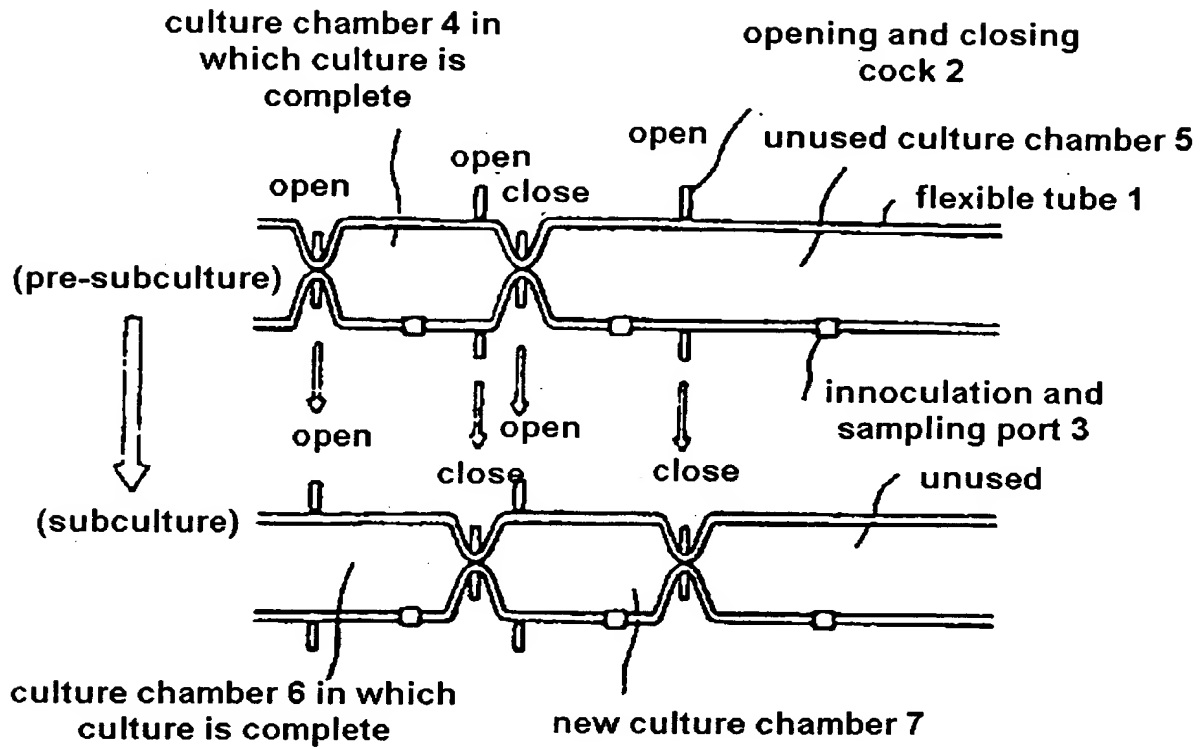


Figure 2

